

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

REC'D	25 MAY 2004
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 13 636.3

**Anmeldetag:** 26. März 2003

**Anmelder/Inhaber:** MediInnova Gesellschaft für medizinische Innovationen aus akademischer Forschung mbH,  
35037 Marburg/DE

**Bezeichnung:** Verwendung von Wirksubstanzen zur Vorbeuge  
oder Behandlung von Viruserkrankungen sowie  
Testsystem zum Aufinden solcher Wirksubstanzen

**IPC:** C 12 Q 1/70

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 19. April 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Faust

**Albrecht, Lüke & Jungblut**  
**Patentanwälte**  
**Gelfertstr 56, 14195 Berlin**

**DE-Patentanmeldung**

Dipl.-Ing. Hans Albrecht  
 Patentanwalt (1933 - 1979)

Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lüke  
 Patentanwalt / European Patent Attorney /  
 European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut  
 Patentanwalt / European Patent Attorney /  
 European Trademark Attorney

Anwaltsakte: MED/DE/0306

Datum: 26.03.03/\*

Anmelder: MedInnova Gesellschaft für medizinische Innovationen aus  
 akademischer Forschung mbH  
 Biegenstrasse 4  
 D-35037 Marburg

Titel: Verwendung von Wirksubstanzen zur Vorbeuge oder Behandlung  
 von Viruserkrankungen sowie Testsystem zum Auffinden sol-  
 cher Wirksubstanzen

Erfinder: 1) Stefan LUDWIG, Langes Gräthlein 21, D-97078 Würzburg  
 2) Oliver PLANZ, Wendelsheimerstr. 34, D-72108 Rottenburg  
 3) Hans-Harald SEDLACEK, Sonnenhang 3, D-35041 Marburg  
 4) Stephan PLESCHKA, Hinter der Ostanlage 5a, D-35390  
 Giessen

Priorität: ---

Verwendung von Wirksubstanzen zur Vorbeuge oder Behandlung  
von Viruserkrankungen sowie Testsystem zum Auffinden sol-  
cher Wirksubstanzen

5

Gebiet der Erfindung.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung minde-  
stens einer Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder Therapie  
10 von einer Viruserkrankung, wobei mindestens eine Wirksub-  
stanz mindestens eine zelluläre Komponente derart hemmt,  
dass eine Virusvermehrung gehemmt wird. Die vorliegende  
Erfindung betrifft des weiteren die Kombination mindestens  
15 einer solchen Wirksubstanz mit mindestens einer weiteren  
verschiedenen antiviral wirksamen Substanz zur Prophylaxe  
und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung.

H Hintergrund und Stand der Technik.

20

Infektionen mit RNA- oder DNA-Viren stellen eine bedeu-  
tende Gesundheitsbedrohung für Mensch und Tier dar.  
Beispielsweise gehören Infektionen mit Influenza-Viren  
immer noch zu den großen Seuchen der Menschheit und for-  
25 dern Jahr für Jahr eine Vielzahl an Todesopfern. Sie sind  
gesamtwirtschaftlich, etwa durch krankheitsbedingte Arbe-  
itsunfähigkeit, ein immenser Kostenfaktor. Von ebenfalls  
wichtiger wirtschaftlicher Bedeutung sind beispielsweise  
Infektionen mit dem Borna Disease Virus (BDV), das vor  
30 allem Pferde und Schafe befällt, jedoch auch schon beim  
Menschen isoliert wurde und hier in Zusammenhang mit neu-  
rologischen Erkrankungen gebracht wird.

Das Problem der Bekämpfung von insbesondere RNA-Viren ist die durch eine hohe Fehlerrate der viralen Polymerasen verursachte Wandlungsfähigkeit der Viren, die sowohl die Herstellung geeigneter Impfstoffe als auch das Entwickeln 5 von antiviralen Substanzen sehr schwierig macht.

Darüberhinaus hat sich gezeigt, dass die Anwendung von antiviralen Substanzen, die direkt gegen Funktionen des Virus gerichtet sind, zwar zu Therapiebeginn eine gute 10 antivirale Wirkung zeigen, aber mutationsbedingt sehr schnell zur Selektion resistenter Varianten führt. Ein Beispiel hierfür ist das anti-Influenza-Agens Amantadin und dessen Derivate, welches bzw. welche gegen ein Transmembranprotein des Virus gerichtet ist bzw. sind. Innerhalb 15 kurzer Zeit nach Anwendung bilden sich resistente Varianten des Virus.

Ein weiteres Beispiel sind die neuen Therapeutika für Influenzainfektionen, die das Influenza-virale Oberflächenprotein Neuraminidase hemmen. Hierzu gehört beispielsweise Relanza. In Patienten wurden bereits Relanza-resistente Varianten gefunden (Gubareva et al., J Infect Dis 178, 1257-1262, 1998). Die Hoffnungen, die in dieses Therapeutikum gelegt wurden, konnten somit nicht erfüllt werden.

25

Aufgrund ihrer meist sehr kleinen Genome und damit verbundener begrenzter Kodierungskapazität für replikationsnotwendige Funktionen sind alle Viren in starkem Maße auf Funktionen ihrer Wirtszellen angewiesen. Durch Einflussnahme 30 auf solche zelluläre Funktionen, die für die virale Replikation notwendig sind, ist es möglich, die Virusreplikation in der infizierten Zelle negativ zu beeinträchtigen. Hierbei besteht für das Virus nicht die

Möglichkeit, durch Anpassung, insbesondere durch Mutationen, die fehlende zelluläre Funktion zu ersetzen, um so dem Selektionsdruck zu entweichen. Dies konnte am Beispiel des Influenza A Virus mit relativ unspezifischen Hemmstoffen gegen zelluläre Kinasen und Methyltransferasen bereits gezeigt werden (Scholtissek und Müller, Arch Virol 119, 111-118, 1991).

Es ist bekannt, dass Zellen über eine Vielzahl von Signalübertragungswegen verfügen, mit Hilfe derer auf die Zelle einwirkende Signale in den Zellkern übertragen werden. Dadurch kann die Zelle auf äußere Reize reagieren und mit Zellproliferation, Zellaktivierung, Differenzierung oder kontrolliertem Zelltod antworten.

15

Diesen Signalübertragungswegen ist gemeinsam, dass sie mindestens eine Kinase enthalten, welche durch Phosphorylierung mindestens ein nachfolgend signalübertragendes Protein aktivieren.

20

Bei Betrachtung der zellulären Prozesse, die nach Virusinfektionen induziert werden, findet man, dass eine Vielzahl von DNA- und RNA-Viren in der infizierten Wirtszelle definierte Signalübertragungswege aktivieren, so beispielsweise den sogenannten Raf/MEK/ERK-Kinase-Signalübertragungsweg oder den MEKK/SEK/JNK Signalübertragungsweg. Neuere Daten zeigen, dass die Inhibition des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalübertragungsweges durch Wirksubstanzen, welche relativ selektiv eine oder mehrere der an diesem Signalübertragungsweg beteiligten Kinasen, beispielsweise die MEK und/oder die SEK inhibieren, die intrazelluläre Vermehrung von intranukleär replizierenden Negativstrang-RNA-Viren, beispielsweise von Influenza A Virus und Borna

Disease Virus (BDV) drastisch hemmen kann (PCT/DE  
01/01292; PCT /DE 02/02810).

Es ist bekannt, dass Viren die Apoptose der infizierten  
5 Zelle induzieren können. Dieses konnte beispielsweise für  
Influenza Viren in vitro und in vivo nachgewiesen werden  
(Fesq et al 1994; Hinshaw et al 1994; Mori et al 1995;  
Takizawa et al 1993). Welches Virusprotein hierbei  
10 proapoptotisch wirkt, ist noch nicht eindeutig geklärt,  
möglicherweise wird die Apoptose der Wirtszelle durch die  
Bildung von Interferon induziert (Balachandran et al 2000)  
oder durch proapoptotische Virusproteine wie beispiel-  
sweise PB1-F2 (Chen et al 2001).

15 Welchen Einfluss die virusinduzierte Apoptose auf die Vi-  
rusvermehrung hat ist unklar. Teils wird angenommen, dass  
die Freisetzung proapoptotischer Virusproteine Lymphozyten  
in die Apoptose führen kann und es hierdurch zu einer re-  
duzierten Immunabwehr gegen die Virusinfizierten Zellen  
20 und zu einer Begünstigung der Virusvermehrung kommen kann  
(van Campen et al 1989; Tumpey et al 2000). Andere ver-  
muten, dass die Apoptose der Wirtszelle über die hierdurch  
verstärkte Phagozytose die Immunreaktion gegen das Virus  
erhöht (Watanabe et al 2002). Andererseits ist bekannt,  
25 dass eine Überexpression des antiapoptotisch wirkenden  
Bcl-2 die Virusvermehrung inhibiert (Hinshaw et al 1994;  
Olsen et al 1996). Im Gegensatz hierzu stehen Befunde,  
dass die Hemmung der Virus-induzierten Apoptose durch  
einen Caspase-Inhibitor keinen Einfluss auf die Synthese  
30 von Virus-Proteinen hatte (Takizawa et al 1999).

Die Apoptose einer Zelle kann außer durch Viren auch durch  
verschiedene andere proapoptotische Mechanismen und

8

Proteine induziert werden. Gemeinsam ist diesen unterschiedlichen Mechanismen und Proteinen, dass sie eine proteolytische zelluläre Kaskadenreihe von Cysteinyl-Proteasen, genannt Caspasen, aktivieren. Die initial ak-  
tivierten Caspasen wie beispielsweise Caspase 8 und Cas-  
pase 9 aktivieren hierbei die Effektor- Kaskaden wie  
beispielsweise die Caspasen 3 und 6. Diese wiederum spal-  
ten eine Reihe von zellulären Substraten und bewirken  
hierdurch die Apoptose der betroffenen Zelle (Übersichten  
bei Cohen 1997; Thornberry und Lazebnik 1998)

A  
Technisches Problem der Erfindung.

15 Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde,  
Wirkstoffe für pharmazeutische Zusammensetzungen, welche  
verbesserte antivirale Wirkung zeigen, sowie ein Testsys-  
tem zur Findung solcher Wirkstoffe anzugeben.

20

Der Erfindung zu Grunde liegende Erkenntnisse.

Es wurde überraschend gefunden, dass i) Influenzaviren für  
ihre Vermehrung die zellulären Caspasen, im besonderen  
25 Caspase 3 benötigen und dass in Zellen ohne Caspase 3 die  
Virus-Genom-Ribonukleoprotein-Komplexe nicht durch die  
Poren der Kernmembran in das Zytoplasma diffundieren kön-  
nen, sondern im Kern verbleiben, ii) die Hemmung minde-  
stens einer zellulären Caspase, im besonderen die Hemmung  
30 der Caspase 3 zu einer deutlichen Inhibition der Verme-  
hrung von Negativ-Strang RNA Viren, im besonderen von In-  
fluenza Viren führt und iii) die Kombination eines  
Inhibitörs für eine Caspase, im Besonderen von Caspase 3,

mit einer anderen antiviral wirkenden Substanz, beispielsweise mit einem Inhibitor für eine zelluläre Kinase, einen synergistischen Effekt auf die Hemmung der Virusvermehrung aufweist.

5

Die überraschende Wirkung von Caspase-Inhibitoren auf die Vermehrung von Viren, im besonderen von Negativ-Strang-RNA Viren, beispielsweise von Influenzaviren wird dadurch verdeutlicht, das diese Inhibition der Virusvermehrung durch 10 Hemmung der Caspase nicht verbunden ist mit einer Hemmung der Synthese von frühen und späten Virusproteinen (zum Beispiel NP oder NS1 (früh) noch von Matrix-Proteinen (M1, spät)) und immer noch beobachtet wurde, wenn der Caspase Inhibitor erst 4h nach Infektion zugegeben wurde.

15

Grundzüge der Erfindung sowie Ausführungsformen.

Zur Lösung des technischen Problems lehrt die Erfindung 20 daher die Gegenstände der Patentansprüche, insbesondere i) die Verwendung mindestens einer Wirksubstanz, welche die Menge oder Aktivität einer zellulären Caspase, im Besonderen der Caspase 3 vermindert, zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Viruserkrankung, im Besonderen einer Virus- 25 erkrankung verursacht durch Negativ-Strang RNA Viren, beispielsweise durch ein Influenza-Virus, ii) die Kombination mindestens einer Wirksubstanz, welche die Menge oder Aktivität einer zellulären Caspase, im Besonderen der Caspase 3 vermindert, mit einer weiteren antiviralen Wirksubstanz und die Verwendung dieser Kombination zur Prophylaxe 30 und/oder Therapie einer Viruserkrankung, im Besonderen einer Viruserkrankung verursacht durch Negativ-Strang RNA Viren, beispielsweise durch ein Influenza-Virus, iii) ein

Testsystem zur Findung einer erfindungsgemäßen Wirksubstanz, wobei dieses Testsystem enthält: 1) eine zelluläre Caspase, vorzugsweise Caspase 3, welche in Kontakt gebracht wird mit einer Prüfsubstanz und gemessen wird, ob sich die Proteaseaktivität der Caspase durch die Prüfsubstanz vermindert, 2) eine Zelle, welche in Kontakt gebracht wird mit einer Prüfsubstanz und gemessen wird, ob sich die Menge oder Aktivität einer zellulären Caspase, vorzugsweise der Caspase 3; durch die Prüfsubstanz vermindert, 3) eine Zelle, welche mit einem Virus, vorzugsweise mit einem Negativ-Strang-RNA Virus, beispielsweise mit einem Influenza Virus infiziert wird und zu welcher nachfolgend eine Prüfsubstanz hinzugegeben wird, welche in der Lage ist, die Menge oder die Aktivität einer zellulären Caspase, vorzugsweise der Caspase 3 zu vermindern und gemessen wird, ob diese Prüfsubstanz die Vermehrung der Viren in dieser Zelle hemmen kann.

Zu den Wirksubstanzen im Sinne der vorliegenden Erfindung gehören beispielsweise:

Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der zellulären Caspase 3, wie beispielsweise Z-DEVD-FMK, Ac-DEVD-CHO, Ac-DMQD-CHO, Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK, Z-D(OMe)QMD(OMe)-FMK (alle vorstehenden: Fa. Alexis Biochemicals), Inhibitoren von zellulären Caspasen, welche Caspase 3 aktivieren können, wie beispielsweise Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der Caspase 9, beispielsweise Z-LE(OMe)HD(OMe)-FMK, Z-LEHD-FMK, Ac-LEHD-CHO (alle Fa. Alexis Biochemicals), Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der Caspase 8, beispielsweise Z-LE(OMe)TD(OMe)-FMK, Ac-ESMD-CHO, Ac-IETD-CHO, Z-IETD-FMK (alle Fa. Alexis Biochemicals), Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der Caspase 10, beispielsweise Ac-AEVD-CHO, Z-AEVD-FMK (beide Fa.

11

Alexis Biochemicals), Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren anderer Caspuren bzw. Granzyme B und pan-Caspase Inhibitoren, beispielsweise Z-VAD-FMK, Z-VAD(OMe)-FMK (beide Fa. Alexis Biochemicals), Ac-YVAD-CHO, Z-YVAD-FMK, Z-VDVAD-FMK, Ac-LEVD-CHO (jeweils Fa. Calbiochem), Dominant negative Mutanten einer zellulären Caspase, im Besonderen der Caspase 3, Antisense-Oligonukleotide, welche sich spezifisch an die DNA-Sequenz oder mRNA Sequenz kodierend für eine zelluläre Caspase anlagern und deren Transkription oder Translation inhibieren, dsRNA Oligonukleotide, die geeignet sind zur gezielten Degradierung der mRNAs einer zellulären Caspase durch die RNAi-Technologie entsprechend der Methode, wie von Tuschl et al (Genes Dev 13: 3191-3197, 1999) und von Zamore et al (Cell 101: 25-33, 2000) beschrieben, Antikörper oder Antikörperfragmente spezifisch für eine zelluläre Caspase, oder Fusionsproteine, enthaltend mindestens ein Antikörperfragment, beispielsweise ein Fv-Fragment, welche die Proteaseaktivität mindestens einer Caspase inhibieren, Inhibitoren, welche indirekt die Expression oder die Aktivierung von zellulären Caspuren, im besonderen von Caspase 3, inhibieren, Expression von Proteinen, welche hemmend auf Caspuren einwirken, beispielsweise die "cellular inhibitors of apoptosis" Proteine cIAP1, cIAP2, das "X-linked inhibitor of apoptosis" Protein XIAP, das antiapoptotische Protein Bcl-2 oder das baculovirale Protein p35.

Bevorzugt erfolgt die Verwendung mindestens einer erfundungsgemäßen Wirksubstanz bei Viruserkrankung, die durch RNA- oder DNA-Viren, vorzugsweise Negativstrang-RNA Viren, beispielsweise Influenza-Viren, oder Borna-Viren, hervorgerufen wird.

- Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Kombinationspräparat zur die Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung, enthaltend mindestens zwei antivirale Wirksubstanzen,
5. wobei mindestens eine Wirksubstanz eine zelluläre Caspase, vorzugsweise die Caspase 3 inhibiert und mindestens eine weitere antivirale Wirksubstanz.

Zu weiteren antiviralen Wirkstoffen gehören beispiel-  
10. sweise 1-Adamantanamin (Amantadin), Rimantadine, Neuraminidase-Inhibitoren wie beispielsweise Relenza, synthetische Nucleosidanaloge wie beispielsweise 3-Deaza adenösin und Ribavirin, antiviral wirkende Inhibitoren der zellulären Kinasen, beispielsweise beschrieben in den Pat-  
15 entanmeldungen PCT/DE 01/01292 und PCT /DE 02/02810.

Die Verabreichung des Kombinationspräparates kann als Mischung der Wirksubstanzen erfolgen. Die Wirksubstanzen können pro Verabreichung jedoch auch getrennt voneinander  
20 an dem gleichen Ort, beispielsweise intravenös, oder auch an voneinander getrennten Orten, gleichzeitig oder auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Zeitraumes, in welchem die zuerst verabreichte Substanz noch Wirkung zeigt, beispielsweise in einem Zeitraum von drei Tagen,  
25 verabreicht werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Testsystem zum Auffinden von Wirksubstanzen, welche mindestens eine zelluläre Caspase, im besonderen,  
30 die Caspase 3, derart hemmt, dass die Vermehrung von Viren, im Besonderen von Negativ-Strang RNA Viren, beispielsweise von Influenza Viren gehemmt wird enthal-  
tend a. mindestens eine mit mindestens einem Virus

13

10

infizierbare Zelle, die entweder mindestens eine Caspase, im Besonderen Caspase 3, enthält und mindestens einen die Zellen infizierenden Virus oder b. mindestens eine mit mindestens einem Virus infizierte Zelle, die mindestens 5 eine Caspase, im Besonderen Caspase 3, enthält.

Zellen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Zellen aus unterschiedlichen Organen und Geweben, beispielsweise Zellen der Blut- und Lymphgefäß, Zellen, die Körperhöhlen 10 auskleiden. Ebenfalls umfasst sind Zellkulturen, besonders solche, welche von Zellbanken, beispielsweise der ATCC, zu erwerben sind, insbesonders permissive, eukaryotische Zellkulturen, beispielsweise A549 (*Homo sapiens*), B82, NIH 3T3, L929, alle aus *Mus musculus*, BHK aus *Cricetus* 15 *cricetus*, CHO aus *Cricetulus griseus*, MDCK aus *Canis familiaris*, Vero, COS-1 und COS-7, alle aus *Cercopithecus aethiops*, sowie primäre Embryo-Fibroblasten aus *Gallus gallus* (CEF cells).

20 Beispielsweise wird in dem erfindungsgemäßen Testsystem zum Auffinden von Wirksubstanzen durch Zugabe von Substanzen, vorzugsweise in Konzentrationen von 0.001 µMol bis 100 µMol, und Viren in einer Partikelzahl, welche die ausgewählte Zelle infizieren können, geprüft, ob eine Substanz 25 in der Lage ist, die Virusvermehrung zu hemmen, ohne die Zelle zu schädigen.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem in dem erfindungsgemäßen Testsystem verwendeten Virus um ein RNA- oder DNA- 30 Virus, vorzugsweise um ein Influenza-Virus.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Zelle des erfindungsgemäßen Testsystems mindestens eine

überexprimierte Caspase, im Besonderen Caspase 3, insbesondere durch Einführung eines oder mehrerer die Caspase kodierenden Gens bzw. Gene. Durch diese Überexpression werden Substanzen entdeckt, welche Caspase sowohl stark 5 inhibieren wie auch intrazellulär zur Inhibition der überexprimierten Caspase eine hohe Konzentration erreichen können.

Zur Kontrolle ist in einer Zelle des erfindungsgemäßen 10 Testsystems die Expression für mindestens eine Caspase, bevorzugt die Caspase 3, inhibiert, beispielsweise a) durch die Einführung einer antisense DNA oder einer antisense RNA oder b) durch die Einführung mindestens eines Genes kodierend für mindestens eine dominant-negative Mutter 15 tante mindestens einer Caspase.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von mindestens einer erfindungsgemäßen Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder 20 Therapie von Viruserkrankungen, welche die Vermehrung von Viren bei Viruserkrankungen hemmt, enthaltend folgende Schritte: a. Inkontaktbringen mindestens eines erfindungsgemäßen Testsystems mit mindestens einer potentiellen Wirksubstanz, und b. Bestimmung der Auswirkung auf die 25 Virusvermehrung.

Inkontaktbringen im Sinne dieser Erfindung kann beispielsweise durch Zugabe der Wirksubstanzen in das Nährmedium einer Zellkultur oder durch lokale oder systemische Verabreichung der Wirksubstanzen in einen Organismus erfolgen. 30

Inkontaktbringen im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst ebenfalls die nach dem Stand der Technik üblichen

AC

12

Verfahren, die das Einführen von Substanzen in intakte Zellen erlauben, beispielsweise Infektion, Transduktion, Transfektion und/oder Transformation, und weitere dem Fachmann bekannte Methoden. Diese Verfahren sind insbesondere 5 bevorzugt, wenn es sich bei der Substanz um Viren, nackte Nukleinsäuren, beispielsweise antisense DNA und/oder antisense RNA, Viroide, Virosomen und/oder Liposomen handelt, wobei Virosomen und Liposomen ebenfalls geeignet sind, neben einem Nukleinsäuremolekül weitere Wirksubstan- 10 zen in die Zelle zu bringen.

Das Bestimmen der Auswirkung auf die Virusvermehrung erfolgt beispielsweise durch Plaque-Assays oder Vergleich von Virustiter infizierter und nichtinfizierter Zellen.

15

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung, welche die Vermehrung von 20 Virien bei Viruserkrankungen im wesentlichen hemmt bzw. hemmen, enthaltend folgende Schritte: a. Durchführen eines erfindungsgemäßen Testsystems und b. Versetzen des/der aufgefundenen Wirksubstanz/en mit mindestens einem Hilfs- und/oder Zusatzstoff.

25

Vorzugsweise wird die Wirksubstanz gemäß vorliegender Erfindung für die lokale oder systemische Verabreichung in einen Organismus mit Hilfe der dem Fachmann geläufigen Methoden und Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zu einem Ar- 30 zneimittel zubereitet.

Geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, die beispielsweise der Stabilisierung oder Konservierung des Arzneimittels oder

Diagnostikums dienen, sind dem Fachmann allgemein bekannt (siehe z. B. Sucker H et al. (1991) Pharmazeutische Technologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart).

Beispiele für solche Hilfs- und/oder Zusatzstoffe sind:

5 physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

10 Die lokale Verabreichung kann beispielsweise auf die Haut, auf die Schleimhaut, in eine Körperhöhle, in ein Organ, in ein Gelenk oder in das Bindegewebe, durch nasale Verabreichung oder durch Inhalation erfolgen. Die systemische Verabreichung erfolgt vorzugsweise in den

15 Blutkreislauf, in die Peritonealhöhle oder in die Bauchhöhle.

Die Arzneimittelzubereitung enthaltend die erfindungsgemäße Wirksubstanz richtet sich nach der Art der Wirksubstanz und der Art ihrer Verabreichung und kann beispielsweise eine Lösung, eine Suspension, eine Salbe, ein Puder, eine Sprayform oder eine andere Inhalationszubereitung darstellen. Vorzugsweise werden Nukleotidsequenzen mit dem Fachmann bekannten Methoden in einen viralen Vektor oder ein Plasmid eingefügt und mit Hilfsstoffen für die Zelltransfektion versetzt. Zu diesen Hilfsstoffen gehören beispielsweise kationische Polymere oder kationische Lipide. Antisense-Oligonukleotide werden mit den dem Fachmann geläufigen Methoden derivatisiert, um sie vor dem enzymatischen Abbau durch DNAsen oder RNAsen zu schützen.

17

Die Wirksubstanz gemäß der Erfindung kann in Form eines Salzes, Esters, Amids oder als eine Vorstufe vorliegen, wobei vorzugsweise nur Modifikationen der Wirksubstanz verwendet werden, die keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen.

Die Wirksubstanz wird unter sterilen Bedingungen, mit einem physiologisch akzeptablen Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern oder Treibmitteln, je nach Bedarf, vermischt. Derartige Trägerstoffe für Arzneimittelzubereitungen sind dem Fachmann geläufig.

Bevorzugt wird die erfindungsgemäße Wirksubstanz in einer einmaligen Dosis, besonders bevorzugt in mehreren Dosen verabreicht, wobei die einzelnen Dosen die maximal tolerable Dosis (MTD) der jeweiligen Wirksubstanz für den Menschen nicht übersteigt. Vorzugsweise wird eine Dosis gewählt, welche die Hälfte der MTD beträgt

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Verabreichung entweder lokal oder systemisch, nur an einem Tag oder über mehrere Tage täglich oder an jedem zweiten oder dritten Tag über mehrere Wochen erfolgen, bis eine therapeutische Wirkung sichtbar wird.

25

Im folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Beispielen näher erläutert.

30 Beispiel 1: Virusvermehrung in Wildtyp und in Caspase 3 defizienten Zellen

Um zu analysieren, ob Caspase, speziell Caspase 3, eine wichtige Rolle in der Influenza Virus Vermehrung spielt, wurde die Aktivität und Expression der Protease(n) auf vier verschiedene Arten gehemmt: a) durch Zugabe eines zellpermeablen Inhibitors (Z-DEVD-FMK), welcher neben anderen Caspase bevorzugt Caspase 3 Aktivität hemmt, b) durch Expression eines inhibitorischen Proteins von Caspase, XIAP. (X-linked inhibitor of apoptosis) (Devereaux et al Nature, 388, 300-304, 1997), welches unter anderem Caspase 3 hemmt, c) durch stabile Transfektion eines Vektors, welcher eine siRNA gegen die mRNA von Caspase 3 bildet, d) durch Untersuchung einer Zelllinie (MCF-7), welche Caspase 3-defizient ist (Jänicke et al. J Biol Chem, 273, 9357-9360) und die durch transiente Transfektion mit Procaspsase 3 komplementiert wurde.

Zu a) wurde wie folgt verfahren. MDCK Zellen wurden mit dem Influenza A Virusstamm Bratislava/79 (Fowl Plague virus, FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 1 (M.O.I.=1) infiziert in Abwesenheit und Anwesenheit steigender Mengen des Caspase Inhibitors Z-DEVD-FMK (2, 4, 20, 40 µM, Alexis Biochemicals), welcher bevorzugt Caspase 3 hemmt. Die der höchsten Inhibitormenge entsprechende Konzentration an DMSO (2%) diente als Lösungsmittelkontrolle. Als weitere Kontrolle wurde das inaktive Inhibitor-Analogon Z-FA-FMK in einer Konzentration von 40 µM angewendet. Nach 24h wurden die Zellüberstände hinsichtlich der Menge an neu gebildeten Viren mit üblichen Methoden (Plaque Titration) untersucht. Parallel dazu wurde die Wirkung des Caspase Inhibitors durch das Maß der Spaltung des zellulären Caspase Substrates PARP (Poly-ADP-Ribose Polymerase), welches unter anderm durch Caspase 3 gespalten wird (Tewari et al Cell 81, 801-809, 1995), im

19

Western Blot von Zellysaten analysiert. Ebenfalls untersucht wurde die Wirkung des Inhibitors auf Expression früher und später viralen Proteine (NS1, NP, M1) im Western Blot. In einer Variation des Experiments wurde der 5 Inhibitor DEVD-FMK in einer Konzentration von 40 µM zugegeben und bereits nach 2h nach Infektion weggeschwommen und durch frisches Medium ersetzt, bzw. erst 4h nach Infektion zugegeben. In einer weiteren Abwandlung des Experiments wurde der Breitband-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK 10 vergleichend in analogen Konzentrationen sowohl in A549, MDCK als auch in Vero Zellen eingesetzt.

Zu b) wurde wie folgt verfahren. MDCK Zellen wurden transfiziert mit einem Vektorplasmid oder mit Plasmiden, welche 15 XIAP oder Procaspsase 3 exprimieren. Die Transfektion wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Life Technologies) nach Standardmethoden (Ludwig et al. J Biol Chem 276, 10990-10998, 2001) durchgeführt. Die Transfektionseffizienzen lagen bei ca. 60%. 24h nach Transfektion erfolgte 20 Infektion mit dem Influenza A Virusstamm Fowl Plague Virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 1 (M.O.I.=1). Weitere 24h nach Infektion wurden die Titer der neu gebildeten Viren im Zellkulturüberstand in Standard Plaque-Assays auf MDCK Zellen überprüft. Die erfolgreiche 25 Expression der transient exprimierten Proteine wurde im Western Blot verifiziert.

Zu c) wurde wie folgt verfahren. Die Lungenepithelzelllinie A549 wurde nach Standardmethoden (Lipofectamine 2000 30 (Life Technologies); Ludwig et al. J Biol Chem 276, 10990-10998, 2001) mit dem Vektor psUPER transfiziert, welcher zur Bildung kleiner interferierender dsRNA Fragmente in der Zelle (siRNA) führt (Brummelkamp et al.

Science, 296, 550-553, 2002). Als Inserts dienten die folgenden Zielsequenzen der Caspase 3 (GenBank Accession No.: NM004346): TGACATCTCGGTCTGGTAC (nt 417-435), CTGGACTGTGGCATTGAGA (734-755) and TACCA GTGGAGGCCGACTT 5 (795-813) (Klone #113, #252 and #311). In einem weiteren Klon (#313) wurde eine Insertion identifiziert. Somit diente dieser Klon als Negativkontrolle. Die Konstrukte wurden gemeinsam mit dem Vektor pCAGI-puro transfiziert um die Zellen selektionierbar mit dem Antibiotikum Puromycin 10 zu machen. 24h nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen und daraufhin mit Medium, welches 1 µg/ml Puromycin enthielt, inkubiert. 24h später wurden die Zellen intensiv mit PBS gewaschen und neues Antibiotika-haltiges Medium zugegeben. Diese Prozedur wurde dann 7 Tage lang in 15 Anwesenheit von 0.6 µg/ml Puromycin wiederholt. Nach 7 Tagen wurden die verschiedenen Zellen auf Expression der Caspase 3 hin untersucht. Ebenfalls nach 7 Tagen erfolgte Infektion der verschiedenen Zelllinien mit dem Influenza A Virusstamm Fowl Plague Virus (FPV) mit einer Multiplizität 20 der Infektion von 1 (M.O.I.=1). Weitere 24h nach Infektion wurden die Titer der neu gebildeten Viren im Zellkulaturüberstand in Standard Plaque-Assays auf MDCK Zellen überprüft.

25 Zu d) wurde wie folgt verfahren. Die Caspase 3-defiziente Brustkarzinom Zelllinie MCF-7 wurden transfiziert mit einem Vektorplasmid oder einem Plasmiden welches Procas- pase 3 exprimiert. Die Transfektion wurde mit dem Trans- fektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Life Technologies) 30 nach Standardmethoden (Ludwig et al. J Biol Chem 276, 10990-10998, 2001) durchgeführt. Die Transfektionsef- fizienzen lagen bei ca. 50%. 24h nach Transfektion erfolgte Infektion mit dem Influenza A Virusstamm Fowl Plague

Virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 1 (M.O.I.=1). Weitere 24h nach Infektion wurden die Titer der neu gebildeten Viren im Zellkulturüberstand in Standard Plaque-Assays auf MDCK Zellen überprüft. Die erfolgreiche Expression von Procaspsase 3 wurde im Western Blot verifiziert.

Es wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

- 10 Zu a): der Caspase 3 Inhibitor Z-DEVD-FMK führte Dosis-abhängig zur Reduktion der Influenza Virus Titer nach 24h bis etwa 60% Hemmung bei einer Konzentration von 40 $\mu$ M. Diese Hemmung korrelierte exakt mit der erreichten Caspase Hemmung, gemessen an der Spaltung des Caspase Substrates 15 PARP. Dies zeigt, dass das Level der Aktivität zellulärer Caspasen, besonders von Caspase 3 direkt mit der Effizienz der Virusvermehrung korreliert und Caspase Inhibitoren zur Hemmung der Influenza Vermehrung eingesetzt werden können. Die gleiche Effizienz der Hemmung der Virusvermehrung.  
20 wurde mit einem pan-Caspase Inhibitor, Z-VAD-FMK sowohl in A549 Zellen als auch in MDCK und Vero Zellen erreicht, während ein inaktives Inhibitor Analogon Z-FA-FMK keine Wirkung zeigte. Zusätzlich wurde beobachtet, dass trotz der hemmenden Effekte auf die Virusvermehrung, Z-DEVD-FMK  
25 keinen signifikanten Einfluss auf die Virusproteinexpression hatte. Dies ist ein Beleg dafür, dass Caspase Aktivität spät in der Virusreplikation benötigt wird. Dies wird unterstützt durch den Befund, dass der Inhibitor immer noch wirksam die Virusvermehrung hemmte, wenn er erst 4h  
30 nach Infektion, also zu späten Zeitpunkten des Replikationszyklus zugegeben wird. Anwesenheit von Z-DEVD-FMK in den ersten beiden Stunden nach Infektion hatte bei nachfolgender Entfernung keine signifikanten Effekte.

Zu b): Expression des Caspase-inhibitorischen Proteins XIAP führte zu einer Reduktion der Influenza Virus Titer nach 24h von etwa 50%. Diese Reduktion korrelierte weit-  
5 estgehend mit der erzielten Hemmung der Caspase Aktivität, gemessen an der verminderten Spaltung des Proteins PARP, welche ebenfalls bei 40-50% der Effizienz der Ausgangsaktivität lag. Umgekehrt konnte durch Expression der Procas-  
pase 3 eine gesteigerte Virusvermehrung in den trans-  
10 fizierten Zellen beobachtet werden. Dies belegt einmal mehr, dass das Level der Caspase 3 Aktivität in Zellen direkt mit der Effizienz der Influenza Virus Replikation korreliert.

15 Zu c): Western Blot Experimente zeigten, dass stabile Expression verschiedener siRNA Segmente in A549 Zellen zu einer mehr oder weniger starken Reduktion der Proteinlevel von Caspase 3 in den verschiedenen Zelllinien führte, während Expression eines Kontroll-siRNA Segmentes keine  
20 Wirkung zeigte. Gemäß dem Grad der Reduktion der Proteinmenge ergaben sich abgestufte Effekte auf die Influenza Virus Replikation in den verschiedenen Linien, wobei das am stärksten hemmende siRNA Segment (#113) zu einer etwa 1,0-fachen Reduktion der Virustiter führte. Das Kontroll-  
25 siRNA Segment (#313) hatte entsprechend keinerlei Effekt auf die Virusvermehrung. Erwähnenswert ist hier, dass die starke Expressionshemmung von Caspase 3 zu einer erhöhten Expression und Aktivität der Caspase 7 in der Zelllinie #113 führte. Dieser als Kompensationsreaktion der Zelle zu  
30 verstehende Effekt konnte die Defekte in der Virusvermehrung jedoch nicht aufheben.

Zu d): Infektion von Wildtyp oder Vektor-transfizierten MCF-7 Zellen führte nur zu sehr geringen Titern an Nachkommenviren, was anzeigt, dass die Replikationseffizienz von Influenza A Viren in diesen Caspase 3-defizienten Zellen sehr gering ist. Wurde jedoch Procas-  
pase 3 durch transiente Transfektion in diese Zellen eingebracht, beobachtete man eine 30-fache Erhöhung der Titer von Nachkommenviren, ein weitere Beleg für die Wichtigkeit von Caspasen, besonders von Caspase 3 für eine effiziente Influenza Virus Vermehrung.

Zusammenfassend kann man aus diesen Ergebnissen den Schluss ziehen, dass der Grad der Expression und Aktivität von Caspasen, besonders von Caspase 3 direkt mit der Effizienz der Influenza Virus Replikation korreliert. Entsprechend bilden Caspasen, insbesondere Caspase 3, Zielpunkte für eine anti-Influenza Virus Prophylaxe oder Therapie.

20

Beispiel 2: Mechanismus der Inhibition der Virusvermehrung durch einen Caspaseinhibitor.

Western Blot Analysen von Zelllysaten Caspase Inhibitor-behandelter Influenza Virus-infizierter Zellen belegten, dass trotz effizienter Hemmung der Virusvermehrung, kein Effekt auf die virale Proteinsynthese eintrat und somit ein später Schritt des Replikationszyklus, wenn die virale Proteinsynthese weitestgehend abgeschlossen ist, von Caspase Aktivität betroffen zu sein scheint (siehe auch Ergebnisse zu a)). Dies wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, dass Caspase Inhibitoren immer noch eine effiziente Hemmung der Virusvermehrung bewirken, wenn sie

erst 4h nach Infektion, also spät im Infektionszyklus, zugegeben werden, während Anwesenheit der Substanzen in den ersten zwei Stunden der Infektion bei nachfolgender Entfernung keine Wirkung hatte. Ein essentieller Schritt 5 spät im Infektionszyklus von Influenza Viren ist der Export neu gebildeter viraler RNA in Form von Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs) aus dem Zellkern der infizierten Zelle. Kürzlich wurde gezeigt, dass Caspase Aktivität in Zellen zu einer Erweiterung der Kernporen führt, was 10 großen Proteinen oder Proteinkomplexen eine freie Diffusion zwischen Zellkern und Zytoplasma erlaubt (Falerio und Lazebnik J Cell Biol, 151, 951-959, 2000). Um zu analysieren, ob Caspase Aktivität regulierend in den Export von viralen Proteinen oder RNPs aus dem Zellkern ein- 15 greift und ob dies durch freie Diffusion der Proteine geschieht wurden folgende experimentelle Ansätze durchgeführt: a) Wildtyp A549 Zellen und A549 Zellen, welche eine Caspase 3 siRNA tragen wurden infiziert und in Immunfluoreszenzanalysen auf die Lokalisation der RNPs hin untersucht, b) Wildtyp MDCK Zellen wurden mit dem Caspase 3 20 Inhibitor Z-DEVD-FMK behandelt und infiziert und ebenfalls in Immunfluoreszenzanalysen auf die Lokalisation der RNPs hin untersucht, c) MDCK Zellen wurden mit einem Plasmid für das Influenza A Virus Nukleoprotein (NP) transfiziert 25 und die Lokalisation des NP wurde in Immunfluoreszenzanalysen nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin in An- und Abwesenheit eines Caspase Inhibitors untersucht, d) MDCK Zellen wurden zur Rekonstitution von RNP Komplexen mit Plasmiden transfiziert, die für das NP und die Influenza 30 Polymerasen PB2, PB1 und PA kodieren, sowie mit einem Plasmid, welches eine Influenza Virus spezifische RNA Matrize exprimiert. Effekte auf die Lokalisation der RNP

Komplexe wurde in An- und Abwesenheit von Caspase Inhibitoren in Immunfluoreszenzanalysen untersucht.

Zu a) wurde wie folgt verfahren. A549 Zellen oder A549  
5 Zelllinien, welche siRNA Segment #113 trugen, wurden infiziert mit dem Influenza A Virusstamm Fowl Plague Virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 3 (M.O.I.=3). 5h nach Infektion wurden die Zellen nach gängigen Methoden (Pleschka et al Nat Cell Biol 3, 10 301-305, 2001) der Immunfluoreszenzanalyse mit einem Ziegen anti-NP Antiserum (Robert Webster, Memphis, USA) und einem anti-Ziege Texas-Red-IgG Sekundärantikörper (Dianova) zugeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop in einer Vergrößerung von 40x.

Zu b) wurde wie folgt verfahren. MDCK Zellen wurden infiziert mit dem Influenza A Virusstamm Fowl Plague Virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 5 (M.O.I.=5) in Anwesenheit von DMSO (2%), dem Caspase 3 Inhibitor Z-DEVD-FMK (40 µM, Alexis Biochemicals), dem inaktiven Inhibitor Analogon Z-FA-FMK (40 µM, Alexis Biochemicals) oder dem MEK Inhibitor U0126 (50 µM, Taros Custom Biochemicals). 5 Stunden nach Infektion wurden die 25 Zellen nach gängigen Methoden (Pleschka et al Nat Cell Biol 3, 301-305, 2001) der Immunfluoreszenzanalyse mit einem Ziegen anti-NP Antiserum (Robert Webster, Memphis, USA) und einem anti-Ziege Texas-Red-IgG Sekundärantikörper (Dianova) zugeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, Färbung des Zytoskeletts erfolgte mit Phalloidin-FITC. Die Visualisierung erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop in einer Vergrößerung von 40x.

Zu c) wurde wie folgt verfahren. MDCK Zellen wurden trans-  
fiziert mit Plasmiden, welche für die Influenza A Virus  
Proteine PB2, PB1, PA und NP kodieren, sowie mit einem  
Plasmid welches eine antisense-RNA für das Grün-  
5 fluoreszierende Protein flankiert von Influenza-Virus  
spezifischen Promotorelementen als Matrize für den Po-  
lymerasekomplex bildet. Es ist bekannt, dass Expression  
dieser Plasmide zu einer Rekonstitution der RNP Komplexe  
führt, was durch Expression des Reportergens, hier GFP,  
10 angezeigt wird (Pleschka et al J Virol, 70, 4188-4192,  
1996). Die Transfektion wurde mit dem Transfektionsreagenz  
Lipofectamine 2000 (Life Technologies) nach Standardmetho-  
den (Ludwig et al. J Biol Chem 276,10990-10998,2001)  
durchgeführt. 16 Stunden nach Transfektion wurden die Zel-  
15 len für 5h mit DMSO, Staurosporin (1M) und DMSO,  
Staurosporin (1M) und Z-DEVD-FMK (40 µM), oder  
Staurosporin (1M) und Leptomycin B (2ng/ml) behandelt.  
Danach wurden die Zellen nach gängigen Methoden (Pleschka  
et al Nat Cell Biol 3, 301-305, 2001) der Immunfluoreszen-  
20 zanalyse mit einem Ziegen anti-NP Antiserum (Robert  
Webster, Memphis, USA) und einem anti-Ziege Texas-Red-IgG  
Sekundärantikörper (Dianova) zugeführt. Die Zellkerne wur-  
den mit DAPI gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit  
einem inversen Fluoreszenzmikroskop in einer Vergrößerung  
25 von 40x.

Zu d) wurde wie folgt verfahren. MDCK Zellen wurden trans-  
fiziert mit einem Plasmid welches für das Influenza A Vi-  
rus NP kodiert. Die Transfektion wurde mit dem  
30 Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Life Technolo-  
gies) nach Standardmethoden (Ludwig et al. J Biol Chem  
276,10990-10998,2001) durchgeführt. 16 Stunden nach Trans-  
fektion wurden die Zellen für 5h mit DMSO, Staurosporin

(1M) und DMSO, Staurosporin (1M) und Z-DEVD-FMK (40 µM), oder Staurosporin (1M) und U0126 (40 µM) behandelt. Danach wurden die Zellen nach gängigen Methoden (Pleschka et al Nat Cell Biol 3, 301-305, 2001) der Immunfluoreszenzanalyse mit einem Ziegen anti-NP Antiserum (Robert Webster, Memphis, USA) und einem anti-Ziege Texas-Red-IgG Sekundärantikörper (Dianova) zugeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop in einer Vergrößerung von 40x.

Es wurde die folgenden Ergebnisse erhalten.

Zu a): Vergleich der Lokalisation der RNP Komplexe (gemäß der Detektion mit einem Antiserum gegen das virale Nukleoprotein (NP), dem Hauptbestandteil der RNPs, zeigte, dass in infizierten A549 Zellen welche siRNA-abhängig eine stark reduzierte Expression von Caspase 3 aufweisen, die RNPs 5h nach Infektion im Zellkern zurückgehalten werden, während in Wildtyp A549 Zellen zur gleichen Zeit die RNPs bereits effizient im Zytosol akkumulieren. Dies zeigt, dass der Grad der Caspase 3 Expression mit der Wanderungseffizienz der RNPs aus dem Zellkern korreliert und deutet an, dass dieser Effekt Caspase 3 vermittelt ist.

25

Zu b): Vergleich der Lokalisation der RNP Komplexe in infizierten MDCK Zellen, welche mit Lösungsmittel oder verschiedenen Inhibitoren inkubiert wurden, zeigte dass die Wanderung der RNPs aus dem Zellkern 5h nach Infektion effizient sowohl durch den Caspase Inhibitor Z-DEVD als auch durch den MEK Inhibitor U0126 gehemmt werden kann, nicht jedoch durch das inaktive Caspase Inhibitor Analogon Z-FA-FMK. Dies ist ein weiterer Beleg, dass Caspasen,

insbesondere Caspase 3 den effizienten Export von RNPs aus dem Zellkern vermitteln.

zu c): Nach transienter Expression in unstimulierten Zellen zeigte das Influenza Virus NP eine nukleäre Lokalisation. Wurde jedoch in diesen Zellen Caspase Aktivität durch Zugabe des Apoptose Induktors Staurosporin induziert, fand man das Nukleoprotein über die ganze Zelle verteilt. Dieses "Ausbluten" aus dem Zellkern konnte verhindert werden durch Zugabe des Caspase 3 Inhibitors Z-DEVD, nicht jedoch durch einen Inhibitor des aktiven Kernexports, Leptomycin B. Dies zeigt an, dass Caspase Aktivität die freie Diffusion von großen Proteinen vermutlich durch ein proteolytisches Erweitern der Kernporen vermitteilt und somit das Wandern des NP ins Cytoplasma fördert.

Zu d): Nach transienter Expression der viralen Proteine PB2, PB1, PA und NP in MDCK Zellen, welche zusätzlich ausgehend von einem Plasmid eine RNA Matrize mit Influenza-Virus spezifischen Promotorregionen exprimieren, die ein GFP Reporter gen flankieren, fand man grün gefärbte Zellen in der Kulturschale, was anzeigt, dass in diesen Zellen intakte RNP Komplexe gebildet wurden. Sowohl GFP als auch die RNP Komplexe befanden sich in unstimulierten Zellen im Nukleus. Wurde jedoch in diesen Zellen Caspase Aktivität durch Zugabe des Apoptose Induktors Staurosporin induziert, fand man sowohl das GFP als auch die RNP Komplexe wiederum über die ganze Zelle verteilt. Entsprechend konnte dieses "Ausbluten" aus dem Zellkern verhindert werden durch Zugabe des Caspase 3 Inhibitors Z-DEVD, nicht jedoch durch einen Inhibitor des aktiven Kernexports, U0126. Dies zeigt an, dass Caspase Aktivität die freie Diffusion von sehr großen Proteinkomplexen vermutlich durch ein

proteolytisches Erweitern der Kernporen vermittelt und somit das Wandern der RNPs ins Zytosoma fördern. Interessant ist hierbei auch, dass die betreffenden Zellen, belegt durch die Hemmbarkeit mit Z-DEVD-FMK, zwar Caspase 5 Aktivität aufweisen, jedoch ansonsten keine morphologischen Zeichen apoptotischer Zellen, wie beispielsweise Membranausstülpungen oder kondensierte Kerne tragen. Dies zeigt, dass bereits initiale Ereignisse der Apoptoseinduktion, wie frühe Caspase Aktivierung ausreichen, um den besseren Kernexport der Proteinkomplexe zu vermitteln. Volle Exekution des apoptotischen Programms ist nicht nötig oder wäre gar kontraproduktiv.

15 Beispiel 3: synergistische Wirkung eines Caspaseinhibitors und eines Kinaseinhibitors in der Hemmung der Virusvermehrung

Es ist bekannt, dass der Export von Influenza Virus RNPs 20 zumindest teilweise durch aktiven Kernexport vermittelt wird (O'Neill et al EMBO J, 17, 288-296, 1998) und entsprechend mit Hemmstoffen der aktiven Kernexportmaschinerie wie Leptomycin B gehemmt werden kann. Es ist ebenfalls bekannt dass der RNP Export in späten Phasen der 25 Replikation durch Hemmung der Raf/MEK/ERK Kinase-Kaskade, unter anderem durch den MEK Inhibitor U0126 gehemmt werden kann, wobei es sich hier um das Interferieren mit einem aktiven Exportmechanismus handelt. Überraschend wurde im Rahmen der Erforschung gefunden, dass der Kernexport von 30 Influenza Virus RNPs alternativ auch durch Caspase Inhibitoren gehemmt werden kann, wobei es sich hier weitestgehend um das Blockieren eines passiven Prozesses handelt.

Es sollte nun geklärt wären ob sich a) der Caspase-aktivierende Signalweg und die Raf/MEK/ERK Kaskade gegenseitig beeinflussen und b) ob durch Hemmung des aktiven Exportes durch U0126 und gleichzeitiger Hemmung der ver-  
5 stärkten passiven Diffusion durch Caspase Inhibitoren, also gewissermassen Blockierung zweier alternativer Exportmechanismen, ein synergistischer Hemmungseffekt auf die Influenza Virusreplikation erzielt werden kann.

10 Zu a) wurde wie folgt verfahren. A549 Zellen wurden infiziert mit dem Influenza A Virusstamm Fowl Plague Virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 1 (M.O.I.=1) in Anwesenheit von DMSO (2%), dem Caspase 3 Inhibitor Z-DEVD-FMK (40 µM, Alexis Biochemicals), oder  
15 dem MEK inhibitor U0126 (40 µM, Taros Coustom Biochemicals). 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate sowohl einem anti-PARP Western Blot zur Bestimmung der Caspase Aktivität als auch einem ERK Immunkomplexkinaseassay nach gängigen Methoden ((Pleschka et  
20 al Nat Cell Biol 3, 301-305, 2001) zur Bestimmung der Aktivität des Raf/MEK/ERK Signalwegs in den infizierten und behandelten Zellen zugeführt.

Zu b) wurde wie folgt verfahren. A549 Zellen und Caspase 25 3-defizierte MCF-7 Zellen wurden infiziert mit dem Influenza A Virusstamm Fowl Plague Virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 1 (M.O.I.=1) in Anwesenheit von DMSO (2%), dem Caspase 3 Inhibitor Z-DEVD-FMK (40 µM, Alexis Biochemicals), oder dem MEK Inhibitor U0126 (40 µM, Taros Coustom Biochemicals). 9h und 24h nach Infektion wurden die Titer der neu gebildeten Viren im Zellkulaturüberstand in Standard Plaque-Assays auf MDCK Zellen überprüft.

Es wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

Zu a): Hemmung von Caspase 3 in infizierten Zellen führte  
5 zu einer verminderten Spaltung des Caspase Substrats PARP,  
nicht jedoch zu einer verminderten Aktivierung des  
Raf/MEK/ERK Signalweges, gemessen am Grad der Virus-  
induzierten Aktivität von ERK im Immunkomplexkinaseassay,  
welche weitestgehend identisch in DMSO und Z-DEVD-FMK be-  
10 handelten Zellen war. Ebenso führte Hemmung von MEK durch  
U0126 in Konzentrationen welche effizient die Virus-  
induzierte Aktivierung von ERK hemmten, nicht zu einer  
veränderten Spaltung von PARP. Dies deutet an, dass die  
Caspase 3 abhängige Kaskade und der Raf/MEK/ERK Signalweg  
15 unabhängig voneinander verschiedene Prozesse vermitteln  
die alternativ den RNP Export fördern und damit die Virus-  
vermehrung effizienter gestalten.

Zu b): wurden in A549 Zellen gleichzeitig Caspasen, bevor-  
20 zugt Caspase 3, durch Z-DEVD-FMK sowie die Raf/MEK/ERK  
Kaskade gehemmt, konnte man einen synergistischen Hemmef-  
fekt auf die Virusreplikation sowohl nach 9h als auch nach  
24h beobachten. Damit konnte also die suboptimale  
Hemmung von weniger als einer Zehnerpotenz durch die  
25 isoliert angewandten Agensien bis >1 log Stufe durch Kom-  
binationsgabe verstärkt werden. In Caspase 3-defizienten  
MCF-7 Zellen hatte Z-DEVD-FMK wie erwartet keine Wirkung  
auf die Virusvermehrung, Allerdings wurden die bereits  
geringen Titer von Nachkommenviren aus diesen Zellen no-  
30 chmals durch Anwendung von U0126 gesenkt. Diese Befunde  
zeigen, dass in der Tat die Caspase Kaskade und der  
Raf/MEK/ERK Signalweg zwei alternative Prozesse zur ef-  
fizienten Unterstützung der Virusvermehrung regulieren und

29

das gemäß dieser Befunde kombinatorische Anwendung von Caspase Inhibitoren und von MEK Inhibitoren ideal geeignet ist um effizient die Vermehrung von Influenza Viren zu hemmen.

5

10

15

20

25

30

## Patentansprüche:

- 1) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass die Wirksubstanz eine zelluläre Caspase derart hemmt, dass eine Virusvermehrung gehemmt wird.
- 2) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz nach Anspruch  
10 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Caspase die Caspase 3 ist.
- 3) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz nach einem der  
15 Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirksubstanz(en) aus nachfolgenden Wirksubstanzen ausgewählt ist bzw. sind:
  - Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der zellulären Caspase 3, wie beispielsweise
    - 20 • Z-DEVD-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
    - Ac-DEVD-CHO (Fa. Alexis Biochemicals)
    - Ac-DMQD-CHO (Fa. Alexis Biochemicals)
    - Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
    - Z-D(OMe)QMD(OMe)-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
  - 25 - Inhibitoren von zellulären Caspasen, welche Caspase 3 aktivieren können, wie beispielsweise
    - Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der Caspase 9, beispielsweise
      - o Z-LE(Ome)HD(OMe)-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
      - o Z-LEHD-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
      - o Ac-LEHD-CHO (Fa. Alexis Biochemicals)
    - Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der Caspase 8, beispielsweise

- Z-L<sup>E</sup>(OMe)TD(OMe)-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
- Ac-ESMD-CHO (Fa. Alexis Biochemicals)
- Ac-IETD-CHO (Fa. Alexis Biochemicals)
- Z-IETD-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
- 5     • Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren der Caspase 10, beispielsweise
  - Ac-AEVD-CHO (Fa. Alexis Biochemicals)
  - Z-AEVD-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
- 10    • Peptid- und Nichtpeptid-Inhibitoren anderer Caspasen bzw. Granzyme B und pan-Caspase Inhibitoren, beispielsweise
  - Z-VAD-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
  - Z-VAD(OMe)-FMK (Fa. Alexis Biochemicals)
  - Ac-YVAD- CHO (Fa. Calbiochem)
  - 15    ○ Z- YVAD- FMK (Fa. Calbiochem)
  - Z- VDVAD- FMK (Fa. Calbiochem)
  - Ac- LEVD- CHO (Fa. Calbiochem)
- 20    - Ein inhibitorisches Peptid, im besonderen Z-VAD-FMK oder Z-DEVD-FMK
- 25    - Ein Nichtpeptid Inhibitor von Caspasen
- dominant negative Mutante einer Caspase
- Antisense-Oligonukleotid, welches sich spezifisch an die DNA-Sequenz oder mRNA-Sequenz kodierend für eine zelluläre Caspase anlagert und deren Transkription bzw. Translation hemmt- ein Protein, welches hemmend auf Caspasen einwirkt, beispielsweise die "cellular inhibitors of apoptosis" Proteine cIAP1, cIAP2, das "X-linked inhibitor of apoptosis" Protein XIAP, das antiapoptotische Protein Bcl-2 oder das baculovirale Protein p35
- 30    - dsRNA Oligonukleotide, die geeignet sind zur gezielten Degradierung der mRNAs einer zellulären Caspase durch RNAi-Technologie;

- Antikörper oder Antikörperfragment, spezifisch für eine Caspase oder ein Fusionsprotein, enthaltend mindestens ein Antikörperfragment, beispielsweise ein Fv-Fragment, das die Proteaseaktivität einer Caspase hemmt.
- 5
- 4) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Viruserkrankung durch RNA- oder DNA-Viren, vorzugsweise, 10 Influenza-Viren, hervorgerufen wird.
- 5) Kombinationspräparat zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung, enthaltend mindestens zwei antivirale Wirksubstanzen, wobei mindestens 15 eine antivirale Wirksubstanz ausgewählt aus den Wirksubstanzen gemäß Anspruch 3, wobei das Kombinationspräparat in Form eines Gemisches oder als einzelne Komponenten zur gleichzeitigen oder zeitlich unterschiedlichen Anwendung an gleichen oder unterschiedlichen Orten anwendbar ist.
- 20
- 6) Kombinationspräparat zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Viruserkrankung, enthaltend mindestens eine Wirksubstanz gemäß einem der Ansprüche 1)-5) und mindestens 25 eine antiviral wirkende Substanz, die ein Kinaseinhibitor ist
- 7) Kombinationspräparat zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Viruserkrankung, enthaltend mindestens eine Wirksubstanz gemäß einem der Ansprüche 1)-5) und mindestens 30 eine antiviral wirkende Substanz, die ein 1-Adamantanamin, Rimantadine, ein Neuraminidaseinhibitor oder ein Nukleosidanalogon wie Ribavirin ist.

- 8) Wirkstoff oder Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 1)-7) für die Prophylaxe und/oder Therapie einer Infektion mit Negativstrang-RNA Viren, im besonderen Influenza Viren oder Bornaviren
- 5
- 9) Testsystem zum Auffinden von Wirksubstanzen, welche entweder auf mindestens eine zelluläre Caspase, im Besonderen auf Caspase 3 derart einwirken, dass eine Virusvermehrung gehemmt wird, enthaltend
- 10 a. mindestens eine mit mindestens einem Virus infizierte Zelle, die mindestens eine zellulären Caspase und mindestens einen die Zellen infizierenden Virus
- 15 oder
- b. mindestens eine mit mindestens einem Virus infizierte Zelle, die mindestens eine zelluläre Caspase enthält.
- 10) Testsystem nach Anspruch 9), dadurch gekennzeichnet,
- 20 dass es sich bei dem Virus um ein RNA- oder DNA-Virus, vorzugsweise um ein Influenza-Virus handelt.
- 11) Testsystem nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle mindestens eine überexprimierte Caspase, im Besonderen Caspase 3, enthält.
- 25
- 12) Testsystem nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Zelle enthält, in welcher mindestens ein Gen kodierend für mindestens eine dominant negative Mutante mindestens einer Caspase exprimiert ist.
- 30

- 13) Testsystem nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zelle enthält, in der die Expression für mindestens eine Caspase, im besonderen der Caspase 3, inhibiert ist.  
5
- 14) Verfahren zum Auffinden von mindestens einer Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder Therapie von Viruserkrankungen, welche die Vermehrung von Viren bei Viruserkrankungen im wesentlichen hemmt bzw. hemmen,  
10 enthaltend folgende Schritte:
  - a) Inkontaktbringen mindestens eines Testsystems nach einem der Ansprüche 9 bis 14 mit mindestens einer potentiellen Wirksubstanz, und
  - b) Bestimmung der Auswirkung auf die Virusvermehrung.
- 15) Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Viruserkrankung, welches die Vermehrung von Viren bei Viruserkrankungen im wesentlichen hemmt, enthaltend folgende Schritte:  
15  
20
  - a) Durchführen eines Testsystems nach einem der Ansprüche 9 bis 15, und
  - b) Versetzen des/der aufgefundenen Wirksubstanz/en mit mindestens einem Hilfs- und/oder Zusatzstoff.
- 25 16) Verwendung zumindest eines Caspase Inhibitors, insbesondere eines Caspase 3 Inhibitors, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Behandlung einer viralen Infektion, insbesondere einer Infektion mit einem RNA negativstrang Virus, vorzugsweise einer Influenza Infektion.  
30
- 17) Verwendung nach Anspruch 16, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich zumindest einen weiteren

2

antiviralen Wirkstoff enthält, welcher kein Caspase Inhibitor ist, insbesondere einen Inhibitor einer oder mehrerer zellulärer Kinasen.

- 5 18) Kombinationspräparat, insbesondere zur Behandlung einer viralen Infektion, enthaltend zumindest einen Caspase Inhibitor sowie einen weitere antiviralen Wirkstoff, welcher kein Caspase Inhibitor ist, insbesondere ein Inhibitor einer oder mehrerer zellulärer Kinasen, jeweils in physiologisch wirksamer Dosis, sowie galénische Hilfs- und Trägerstoffe, wobei der Caspase Inhibitor und der weitere antivirale Wirkstoff in Mischung oder in separaten galénischen Herrichtungen, bestimmt zur gleichzeitigen oder in beliebiger Folge aufeinanderfolgenden Gabe, vorliegen können.
- 10 19) Verwendung oder Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei der Caspase Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus dem Substanzen nach Anspruch 3 und Mischungen solcher Substanzen.
- 15 20) Verwendung oder Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei der weitere antivirale Wirkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Neuraminaseinhibitoren, Nukleosidanaloge, 1-Adamantanamin, Rimantadine, Ribavirin, Relenza, 3-Deazaadenosin, MEK Inhibitoren, insbesondere aus den Stoffgruppen der Butadien-Derivate, Flavenderivate und Benzamid-Derivate, 2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-(1)benzopyran, U0126, PD18453, PD98059, Inhibitoren einer Kinase des NF- $\kappa$ B Signalübertragungsweges, z.B. nicht-steroidale anti-inflammatoryische, die NF- $\kappa$ B Aktivierung inhibierende Substanzen wie beispielsweise
- 25
- 30

Phenylalkylsäurederivate wie beispielsweise Sulindac oder  
Derivate von Sulindac wie Sulindac-Sulfoxid, Sulindac-  
Sulfon, Sulindac-Sulfid, Benzylamid Sulindac-Analoga,  
Salicylsäurederivate, wie beispielsweise Salicylsäure oder  
5 Acetylsalizylsäure, Salicylamid, Salacetamid, Ethenzamid,  
Diflunisal, Olsalazin oder Salazosulfapyridin, Curcumin,  
Antioxidantien wie Pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC),  
Oxicame wie beispielsweise Piroxicam, Vitamin E und Deri-  
vate hiervon, wie beispielsweise Pentamethyl-  
hydroxychroman (PMC), 17 beta Oestradiol und Derivate  
10 hiervon, Polyphenole des Tees wie beispielsweise (-) -  
epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Bay11-7182, Peptide,  
welche die Interaktion von mindestens zwei Komponenten des  
NF-kB Signalübertragungsweges inhibieren, beispielsweise  
an NEMO bindende Peptide, Inhibitoren des Proteasoms,  
15 beispielsweise PS-341 und Lactacystin, An-  
tisense-Oligonukleotide, welche sich spezifisch an die  
DNA-Sequenz oder m-RNA Sequenz kodierend für eine Kompo-  
nente des NF-kB Signalübertragungsweges anlagern und deren  
Transkription oder Translation inhibieren, beispielsweise  
Antisense Nukleotidsequenzen spezifisch für p65 oder p50,  
20 Dominant negative Mutanten einer Komponente des NF-kB Sig-  
nalübertragungsweges, dsOligonukleotide, die geeignet sind  
zur gezielten Degradierung der mRNAs einer Komponente des  
NF-kB Signalübertragungsweges durch die RNAi-Technologie,  
Antikörper oder Antikörperfragmente spezifisch für eine  
25 Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges, oder Fusion-  
sproteine, enthaltend mindestens ein Antikörperfragment,  
beispielsweise ein Fv-Fragment, welche mindestens eine  
Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges inhibieren,  
Kinase-inhibierendes Flavon-Derivat oder Benzopyran-  
30 Derivat; Kinase-inhibierendes Derivat des  
4H-1-Benzopyran; Flavopiridolderivat;  
2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-(1) benzopyran;  
7,12-Dihydro-indolo-(3,2-d)(1) Benzazepin-6(5H)-on;

4

7OH-Staurosporin und/oder ein Phosphokinase-inhibierendes Derivat des 7OH-Staurosporin; Butyrolacton; Roscovitine; Purvalanol A; Emodin; Anilinoquin-azolin; Phenylaminopyrimidin; Trioylimidazol; Paullon; [4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol; (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2aminophenylthio) butadien; Kinase-inhibierendes Derivat des Butadien; [2-2'-Amino-3'-methoxyphenyl]-oxa-naphtalen-4-on); [2-(2-Chlor-4-jod-phenylamino)-N-cyclo-propylmethoxy-3,4-difluor benzamid; CEP-1347 (KT7515) bis-ethylthiomethyl; Tetrapyrrolisches Makrocyclen; Pyrimidonederivat; 3-Aminomethylen-indolin-Derivat; Pyrazolo (3,4-b) pyridin-Derivat; Pyrazol-Derivat; 1,4-substituiertes Piperidinderivat; lipoides Ammoniumsalz; dominant negative Mutante einer Kinase eines zellulären Signalübertragungsweges; Antisense-Oligonukleotid, welches sich spezifisch an die DNA-Sequenz oder mRNA-Sequenz kodierend für eine Kinase eines zellulären Signalübertragungsweges anlagert und deren Transkription bzw. Translation hemmt; dsOligonukleotide, die geeignet sind zur gezielten Degradierung der mRNAs von Kinasen eines zellulären Signalübertragungsweges durch RNI-Technologie; Antikörper oder Antikörperfragment, spezifisch für eine Kinase oder ein Fusionsprotein, enthaltend mindestens ein Antikörperfragment, beispielsweise ein Fv-Fragment, das die Kinaseaktivität eines Kinasemoduls hemmt; und/oder Peptid, das die Interaktion von mindestens zwei, vorzugsweise unmittelbar nacheinander aktivierbarer, Kinasen eines zellulären Signalübertragungsweges hemmt und Mischungen solcher Substanzen".

21) Verfahren zum Screenen nach prospektiven antiviralen Wirkstoffen mit den folgenden Verfahrensschritten:

5

a) eine Zelle enthalten eine Caspase, insbesondere Caspase 3, wird mit einem Virus, insbesondere einem RNA negativstrang Virus, vorzugsweise einem Influenza Virus infiziert,

10

b) die Zelle wird mit einem oder mehreren prospektiven Wirkstoffen kontaktiert,

15

c) es wird die virale Replikation in der Zelle bestimmt,

20

d) ein Wirkstoff oder eine Wirkstoffmischung wird selektiert, wenn die in Stufe c) gemessene virale Replikation niedriger ist als bei Durchführung der Stufen a) bis c), jedoch ohne prospektiven Wirkstoff oder mit inaktivem Wirkstoff,

25

e) optional wird ein selekterter Wirkstoff mit einer mit einem Virus infizierten Zelle, welche keine Caspase, insbesondere keine Caspase 3, exprimiert oder enthält, kontaktiert und die virale Replikation gemessen, wobei der Wirkstoff weiterhin selektiert wird, wenn die Messung der viralen Replikation keine signifikante Veränderung gegenüber einer Messung bei Kontaktierung dieser infizierten Zelle mit einem inaktiven Wirkstoff oder ohne Wirkstoff ergibt.

30

wobei die Stufen a) und b) in beliebiger Reihenfolge oder gleichzeitig, und wobei die Stufen a) bis d) einerseits und die Stufe e) andererseits in beliebiger Reihenfolge oder gleichzeitig erfolgen können.

5

10

15

20

25

30

GESAMT SEITEN 45